



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان کرمان
دانشکده پزشکی مهندس افضلی پور

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکترای تخصصی جراحی مغز و اعصاب

عنوان

بررسی نقش هورمون های آدرنال بر آپوپتوز سلولی و دژنراسانس دیسک بین مهره ای ناشی
از استرس هیجانی مزمن در رت

استاد راهنما:

دکتر حامد ریحانی

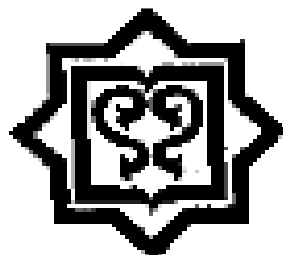
استاد مشاور:

دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

پژوهش و نگارش:

دکتر محمدحسین محمدی

سال ۱۳۹۹



**Kerman University of Medical Sciences
And Health Systems**

Thesis

To receive a doctorate in neurosurgery

Title

**The role of adrenal hormones on cell apoptosis and intervertebral
disc degeneration due to chronic emotional stress in rats**

Supervisor:

Dr. Hamed Reyhani

Advisor:

Dr. Saeed Ismaili Mahani

Research and writing:

Dr. Mohammad Hussein Mohammadi

2021

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
1	
چکیده فارسی.....	۵
چکیده انگلیسی.....	۷
فصل اول: مقدمه.....	۱
فصل دوم.....	۷
مروری بر مطالعات انجام شده.....	۷
فصل سوم.....	۱۰
مواد و روش ها.....	۱۰
۳-۱- حیوانات مورد مطالعه.....	۱۱
۳-۲- گروه های آزمایشی.....	۱۱
۳-۳- روش ایجاد استرس مزمن:.....	۱۲
۳-۴- روش اثبات وجود استرس:.....	۱۲
۳-۵- روش ایجاد دژنراسانس تجربی دیسک بین مهره ای و آماده سازی نمونه ها.....	۱۲
۳-۶- روش انجام آدرنالکتومی:.....	۱۳
۳-۷- روش اثبات عدم وجود آدرنال:.....	۱۳
۳-۸- روش وسترن بلات.....	۱۳
۱-۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز.....	۱۳
۱-۲-۲- بافرها و محلول های مورد استفاده.....	۱۴
۱-۲-۳- استخراج پروتئین از دیسک بین مهره ای.....	۱۵
۵-۲-۱- انتقال از ژل به کاغذ <i>PVDF</i>	۱۵
۶-۲-۱- بلاکینگ.....	۱۶
۱-۲-۷- مرحله شستشو.....	۱۶
۸-۲-۱- اضافه کردن آنتی بادی اولیه.....	۱۶
۱-۲-۹- اضافه کردن آنتی بادی ثانویه.....	۱۷
۱۰-۲-۱- افزودن سوبسترا و ثبت باندهای نورانی روی فیلم رادیولوژی.....	۱۷
۱۱-۲-۱- ظهور فیلم.....	۱۷
۱۲-۲-۱- زدودن آنتی بادی های متصل به آنتی ژن از روی کاغذ و کنترل لودینگ نمونه ها.....	۱۷
تجزیه و تحلیل داده ها:.....	۱۸
فصل چهارم.....	۱۹
نتایج.....	۱۹
۴-۱- ارزیابی اثر برداشتن غده ی آدرنال و القای استرس بر میزان کورتیکواسترون سرمی.....	۲۰
۴-۲- ارزیابی اثر برداش.....	۲۱
۴-۳- ارزیابی اثر برداشتن غده ی آدرنال و القای استرس بر درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل.....	۲۲
فصل پنجم.....	۲۳
بحث و نتیجه گیری.....	۲۳
منابع و مآخذ.....	۲۷

فهرست جداول و نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار ۱-۴ بررسی میزان کورتیکواسترون	۲۰
نمودار ۲-۳ بررسی بیان نسبت Bax/Bcl-2 در گروههای کنترل	۲۱
جدول ۱-۳ بررسی درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل	۲۲

چکیده فارسی

خلاصه

هدف: بررسی نقش هورمون های آدرنال بر دژنرسانس دیسک بین مهره ای ناشی از استرس هیجانی مزمن در رت هایی که تحت آدرنالکتومی قرار گرفتند.

ضرورت مطالعه: از علل اصلی کمر درد دژنرسانس دیسک بین مهره ای است. استرس باعث افزایش کمردرد و همچنین کاته کول آمین های آدرنال می شود. بین استرس هیجانی مزمن و دژنرسانس دیسک بین مهره ای ارتباط ثابت شده وجود دارد و ممکن است اثر استرس بر افزایش دژنرسانس از طریق هورمون های آدرنال باشد.

روش: آپوپتوز و دژنرسانس به صورت مولکولی (وسترن بلات) در دیسک بین مهره ای رت بررسی شد. آدرنالکتومی جهت حذف هورمون های آدرنال انجام شد. ارزیابی القای استرس و حذف غده ی آدرنال توسط کورتیکواسترون بررسی شد.

بحث: استرس باعث افزایش کورتیکواسترون سرم می شود. در موارد انجام آدرنالکتومی سطح سرمی کورتیکواسترون غیر قابل تشخیص است. استرس و آدرنالکتومی سبب افزایش آپوپتوز می شود. نتیجه گیری: استرس مزمن سبب افزایش دژنراسیون دیسک بین مهره ای می شود و مکانیسم آن از طریق آپوپتوز می شود از طرف استرس در حیوانات فاقد غده ی آدرنال آپوپتوز کمتری را ایجاد میکند که نشان دهنده ی نقش محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال میباشد ولی احتمالاً این تنها مسیر دخیل در آسیب دیسک ناشی از استرس نیست.

کلمات کلیدی: دیسک بین مهره ای، دژنرسانس دیسک، آدرنالکتومی، آپوپتوز، استرس هیجانی مزمن

چکیده انگلیسی

Abstract

Objective: To investigate the role of adrenal hormones on intervertebral disc degeneration due to chronic emotional stress in rats that underwent adrenalectomy.

Need to study: One of the main causes of low back pain is intervertebral disc degeneration. Stress increases low back pain as well as adrenal catecholamines. There is a proven link between chronic emotional stress and intervertebral disc degeneration, and stress may have an effect on increasing degeneration through adrenal hormones.

Method: Apoptosis and degeneration were examined molecularly (Western blott) in rat intervertebral disc. Adrenalectomy was performed to remove adrenal hormones. Evaluation of stress induction and adrenal gland removal was performed by corticosterone.

Discussion: Stress increases serum corticosterone. In cases of adrenalectomy, serum corticosterone levels are undetectable. Stress and adrenalectomy increase apoptosis.

Conclusion: Chronic stress increases intervertebral disc degeneration and its mechanism is through apoptosis. Stress causes less apoptosis in animals without adrenal gland, which indicates the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but this is probably the only pathway involved. Disc damage is not caused by stress.

Keywords: Intervertebral disc, Disc degeneration, Adrenalectomy, Apoptosis, Chronic emotional stress

منابع و مأخذ

- ١٠ Turk DC, Gatchel RJ. Psychological approaches to pain management: a practitioner's handbook: Guilford publications; 2018.
- ١١ Merskey H. International Association for the Study of Pain, Classification of chronic pain: Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Pain. 1996;3:1-224.
- ١٢ Merskey H, Lau C, Russell E, Brooke R, James M, Lappano S, et al. Screening for psychiatric morbidity. The pattern of psychological illness and premorbid characteristics in four chronic pain populations. Pain. 1987;30(2):141-57.
- ١٣ Borenstein DG. Chronic low back pain. Rheumatic Disease Clinics. 1996;22(3):439-56.
- ١٤ Lewis S, Holmes P, Woby S, Hindle J, Fowler N. The relationships between measures of stature recovery, muscle activity and psychological factors in patients with chronic low back pain. Manual therapy. 2012;17(1):27-33.
- ١٥ Furlan AD, Brosseau L, Imamura M, Irvin E. Massage for low-back pain: a systematic review within the framework of the Cochrane Collaboration Back Review Group. Spine. ١١٠-١٨٩٩:(١٧)٢٧;٢٠٠٢ .
- ١٦ Sherman KJ, Cherkin DC, Erro J, Miglioretti DL, Deyo RA. Comparing yoga, exercise, and a self-care book for chronic low back pain: a randomized, controlled trial. Annals of internal medicine. 2005;143(12):849-56.
- ١٧ Roach KE, Brown MD, Albin RD, Delaney KG, Lipprandt HM, Rangelli D. The sensitivity and specificity of pain response to activity and position in categorizing patients with low back pain. Physical therapy. 1997;77(7):730-8.
- ١٨ Nicholas M, Molloy A, Beeston L, Tonkin L. Manage your pain: practical and positive ways of adapting to chronic pain: Souvenir Press Ltd; 2012.
- ١٩ Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. The lancet. 1999;354(9178):581-5.
- ٢٠ Luoma K, Riihimäki H, Luukkonen R, Raininko R, Viikari-Juntura E, Lamminen A. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. Spine. 2000;25(4):487-92.
- ٢١ Miller JA, Schmatz C, Schultz A. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. Spine. 1988.٨-١٧٣:(٢)١٣;
- ٢٢ KOTİL K, Mustafa E, AKÇETİN M, Cengiz A, BİLGE T. Do the Spinal Pathologies that Accompany Lumbar Disc Disease Affect Surgical Prognosis? Turkish Neurosurgery. 2006;16.(٤)
- ٢٣ Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG.

Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine*. 2002;27(23):2631-44.

.۱۵ Yu J, Peter C, Roberts S, Urban JP. Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *Journal of anatomy*. 2002;201(6):465-75.

.۱۶ Pouriesa M, Fouladi RF, Mesbahi S. Disproportion of end plates and the lumbar intervertebral disc herniation. *The Spine Journal*. 2013;13(4):402-7.

.۱۷ Varlotta G, Brown M, Kelsey J, Golden A. Familial predisposition for herniation of a lumbar disc in patients who. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73:124-8.

.۱۸ Ala-Kokko L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Annals of medicine*. 2002;34(1):42-7.

.۱۹ Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connective tissue research*. 2001;42(3):197-207.

.۲۰ Hastreiter D, Ozuna RM, Spector M. Regional variations in certain cellular characteristics in human lumbar intervertebral discs, including the presence of α -smooth muscle actin. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19(4):597-604.

.۲۱ Khalatbari MR, Yahyavi ST, Borghei-Razavi H, Ghalaenovi H. Upper lumbar disc herniation presenting as acute abdomen. *Acta Medica Iranica*. 2009;427-9.

.۲۲ Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2006;8(4):383-95.

.۲۳ Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Canadian Medical Association Journal*. 1976;115(1):53.

.۲۴ McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European journal of pharmacology*. 2008;583(2-3):174-85.

.۲۵ Woolverton W, Ator NA, Beardsley P, Carroll ME. Effects of environmental conditions on the psychological well-being of primates: A review of the literature. *Life sciences*. 1989;44(14):901-17.

.۲۶ Chigurupati S, Son TG, Hyun D-H, Lathia JD, Mughal MR, Savell J, et al. Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. *J Endocrinol*. 2008;199(2):333-41.

.۲۷ Ishida H, Mitsui K, Nukaya H, Matsumoto K, Tsuji K. Study of active substances involved in skin dysfunction induced by crowding stress. I. Effect of crowding and isolation on some physiological variables, skin function and skin blood perfusion in

hairless mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003;26(2):170-81.

.28 Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological psychiatry*. 2000;48(8):755-65.

.29 Pilipović K, Župan Ž, Dangubić B, Mršić-Pelčić J, Župan G. Oxidative stress parameters in different brain structures following lateral fluid percussion injury in the rat. *Neurochemical research*. 2011;36(5):913-21.

.30 Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*. 1964;10(4):643-9.

.31 Podesta F, Romeo G, Liu W-H, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):1025-32.

.32 Huang X, Wang F, Chen W, Chen Y, Wang N, von Maltzan K. Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain research*. 2012;1469:82-91.

.33 Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(25):15035-40.

.34 Nicholson DW, Thornberry NA. Life and death decisions. *Science*. 2003;299(5604):214-5.

.35 Kermani HR, Hoboubati H, Esmaeili-Mahani S, Asadi-Shekaari M. Induction of intervertebral disc cell apoptosis and degeneration by chronic unpredictable stress. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2014;20(5):578-84.

.36 Dagnino-Subiabre A, Orellana JA, Carmona-Fontaine C, Montiel J, Díaz-Velíz G, Serón-Ferré M, et al. Chronic stress decreases the expression of sympathetic markers in the pineal gland and increases plasma melatonin concentration in rats. *Journal of neurochemistry*. 2006;97(5):1279-87.

.37 Turgut M, Yenisey Ç, Akyüz O, Öszunar Y, Erkuş M, Biçakçı T. Correlation of serum trace elements and melatonin levels to radiological, biochemical, and histological assessment of degeneration in patients with intervertebral disc herniation. *Biological trace element research*. 2006;109(2):123-34.

.38 Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, de Sá Lima L, Avellar MCW, et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(14):3813-20.

- ۳۹ Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20(6):880-4.
- ۴۰ Moien M. Inpatient utilization of short-stay hospitals by diagnosis, United States, 1973. 1976.
- ۴۱ Spengler D, Bigos SJ, Martin NA, Zeh J, Fisher L, Nachemson A. Back injuries in industry: a retrospective study. I. Overview and cost analysis. *Spine*. 1986;11(3):241-5.
- ۴۲ Habibi Z, Maleki F, Meybodi AT, Mahdavi A, Saberi H. Lumbosacral sagittal alignment in association to intervertebral disc diseases. *Asian spine journal*. 2014;8(6):813.
- ۴۳ Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *JBJS*. 2006;88(suppl_2):10-4.
- ۴۴ Wang S, Rui Y, Lu J, Wang C. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration: current understanding and implications for potential therapeutic strategies. *Cell proliferation*. 2014;47(5):38.۹۰-۹۱
- ۴۵ Freemont A. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology*. 2009;48(1):5-10.
- ۴۶ Phillips KLE, Jordan-Mahy N, Nicklin MJ, Le Maitre CL. Interleukin-1 receptor antagonist deficient mice provide insights into pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(11):1860-7.
- ۴۷ Wang M, Li S, Xie W, Shen J, Im H, Holz J, et al. Activation Of B-Catenin Signalling Leads To Temporomandibular Joint Defects. *European cells & materials*. 2014;28:223.
- ۴۸ Hazard RG. Chronic low back pain and disability: the efficacy of functional restoration. *Bulletin (Hospital for Joint Diseases (New York, NY))*. 1996;55(4):213-6.
- ۴۹ Mokhtaripoor M, Siadat S, Amiri S. Emotional quotient and the pathogenesis of mental disorders [in Farsi]. *The Quarterly Journal of Updates in Psychotherapy*. 2006;41:54-63.
- ۵۰ Rauch SL, Shin LM. Structural and functional imaging of anxiety and stress disorders. 2002.
- ۵۱ Chida Y, Sudo N, Kubo C. Does stress exacerbate liver diseases? *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21(1):202-8.
- ۵۲ Jahn G, Deis R. Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. *Journal of endocrinology*. 1986;110(3):423-8.

- Δϣ Charbonneau AM, Mezulis AH, Hyde JS. Stress and emotional reactivity as explanations for gender differences in adolescents' depressive symptoms. *Journal of youth and adolescence*. 2009;38(8):1050-8.
- ΔϜ Kullowatz A, Rosenfield D ,Dahme B, Magnussen H, Kanniess F, Ritz T. Stress effects on lung function in asthma are mediated by changes in airway inflammation. *Psychosomatic medicine*. 2008;70(4):468-75.
- ΔΔ Won H-Y, Park J-B, Park E-Y, Riew KD. Effect of hyperglycemia on apoptosis of notochordal cells and intervertebral disc degeneration in diabetic rats. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2009;11(6):741-8.
- ΔϞ Cameron HA, Gould E. Distinct populations of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis in response to adrenalectomy. *Journal of Comparative Neurology*. 1996;369(1):56-63.
- ΔΥ Chen J, Graham SH, Nakayama M, Zhu RL, Jin K, Stetler RA, et al. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1997;17(1):2-10.
- ΔΛ Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*. 1995;15(10):6364-76.
- ΔϷ Chang HY ,Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):821-46.
- Ϟ• Boatright K. salvesen Gs. Mechanisms of caspase activation *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:725-31.



وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمان

دانشکده پزشکی - آموزش بالینی

نمره نهایی دفاع از پایان نامه

پایان نامه تحصیلی دکتر محمدحسین محمدی

تحت عنوان: بررسی نقش هورمون های آدرنال بر آپوپتوز سلولی و دژنراسی دیسک بین مهره ای ناشی از استرسی هیجانی
مزمّن در رت

جهت دریافت درجه دکترای تخصصی جراحی مغز و اعصاب

در تاریخ 99/11/20 با حضور اساتید راهنما و اعضای محترم هیئت داوران دفاع و با میانگین نمره 19 مورد تایید قرار
گرفت.

سمت

استاد راهنما

دانشیار

دکتر حامد ریحانی کرمانی

مهر و امضای مسئول شورای پژوهشی بالینی

دکتر محمدحسین محمدی
موضوع: بررسی نقش هورمون های آدرنال بر آپوپتوز سلولی و دژنراسی دیسک بین مهره ای ناشی از استرسی هیجانی مزمّن در رت



REDMI NOTE 8 PRO
AI QUAD CAMERA



مرکز آموزشی درمانی فسیلی پور

صور جلسه دفاع از پایان نامه

جلسه دفاع از پایان نامه خانم آقای محمد حسن مهری دانشجوی دوره تحقیق برادر امیر دانشکده پزشکی

افضلی پور با عنوان

بررسی نقش مورچه های آلوده تال به آلودگی و سلب سلامت در بیمارستان های استان کرمان در

در ساعت ۱۵ روز دوشنبه تاریخ ۱۱/۱۱/۹۹ با حضور اعضای محترم هیئت داوران و نماینده شورای پژوهشی

بالیانی دانشکده پزشکی برگزار گردید.

سمت	نام و نام خانوادگی	نمره (از بیست)	مهر و امضاء
استاد(ان) راهنما	دکتر حامد رحمانی	۲۵	
استاد(ان) مشاور			
عضو هیات داوران	دکتر علی ابراهیم نژاد	۱۹	
عضو هیات داوران	دکتر سعید کاظمی نژاد	۲۰	
عضو هیات داوران (نماینده شورای پژوهشی بالینی)	دکتر حسن سبها	۲۰	

پس از استماع مراحل اجرا و نتایج حاصله، پایان نامه با درجه عالی و نمره ۱۹ (از بیست) مورد تأیید قرار گرفت.

روال برگزاری جلسه دفاع از پایان نامه و صحت مدارک ارائه شده شامل خلاصه مقالات و مقالات استخراج شده از پایان نامه مورد تأیید

اینجانب دکتر حسن سبها نماینده شورای پژوهشی بالینی می باشد.

مهر و امضاء